

ROYAUME DE BELGIQUE



MINISTÈRE DES AFFAIRES ÉCONOMIQUES

# BREVET D'INVENTION

N° 869.485

Classif. Internat.: C 07 D / A 61 K

Mis en lecture le:

01-12-1978

Le Ministre des Affaires Économiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;

Vu le procès-verbal dressé le 3 août 1978 à 14 h 30  
au Service de la Propriété industrielle;

## ARRÊTE :

Article 1. — Il est délivré à l'Association à but scientifique dite:  
INSTITUT INTERNATIONAL DE PATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE,  
Bruxelles,

repr. par le Cabinet Bede à Bruxelles,

un brevet d'invention pour: Nouveaux dérivés de la doxorubicine, leur  
préparation et les compositions qui les contiennent,

Article 2. — Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et  
périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit  
de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention  
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'inventeur et déposés à l'appui  
de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 31 août 1978.

PAR DELEGATION SPECIALE:

Le Directeur

Inventor: Dubois, et al.  
Serial No.: 09/679.442  
Docket No. COUL-015/02US  
F1

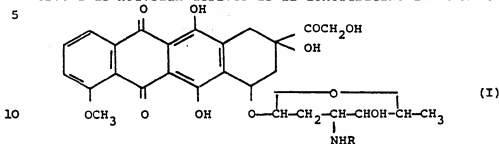
889485

L'Association à but scientifique dite :  
INSTITUT INTERNATIONAL DE PATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE  
à Bruxelles (Belgique)

-----  
Nouveaux dérivés de la doxorubicine, leur préparation et les  
compositions qui les contiennent.

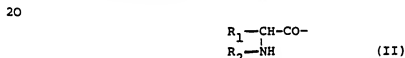
1 889485

La présente invention qui est due à Messieurs  
Roger BAURAIN, 10 Clos des Erables à Kraainem (Belgique) et  
André TROUET, 29, Predikherenweg à Winksele (Belgique) est rela-  
tive à de nouveaux dérivés de la doxorubicine de formule générale:



15 ainsi que leurs sels d'addition avec les acides, leur procédé  
de préparation et les compositions pharmaceutiques qui les  
contiennent.

Dans la formule générale (I), R représente un radical  
de formule générale

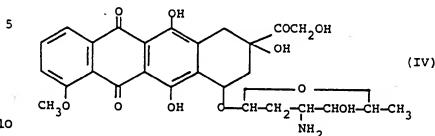


dans laquelle  $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un radical  
alcoyle (éventuellement substitué par un radical amino, alcoyl-  
25 amino, dialcoylamino, hydroxy, mercapto ou méthylthio), un ra-  
dical phényle ou un radical benzyle éventuellement substitué  
sur le cycle par un ou deux radicaux hydroxy et  $R_2$  représente  
un atome d'hydrogène ou forme avec  $R_1$  un radical alcoylène  
contenant 3 ou 4 atomes de carbone, étant entendu que les dif-  
30 férents radicaux et portions alcoyle contiennent 1 à 4 atomes  
de carbone en chaîne droite ou ramifiée et que les produits  
de formule générale (I) dérivent le cas échéant des formes D,  
L ou DL de l'acide-amino de formule générale



Selon la présente invention, les nouveaux dérivés de  
formule générale (I) peuvent être obtenus par action d'un amino-

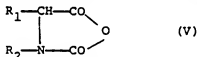
acide de formule générale (III) sous une forme activée dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  sont définis comme précédemment sur la doxorubicine de formule :



15 selon toutes les méthodes connues employées en chimie peptidique.

Dans tous ces procédés, il est particulièrement avantageux de protéger la fonction amine et d'activer le groupe carboxyle de l'acide de formule générale (III), selon l'une des méthodes suivantes :

20 a) On peut, par exemple, réaliser simultanément la protection de la fonction amine et l'activation du groupe carboxyle en préparant un N-carboxyanhydride de formule générale :



dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  sont définis comme précédemment, par action du phosgène sur l'acide de formule générale (III).

La condensation du produit de formule (IV) avec le produit de formule générale (V) s'effectue généralement en milieu aqueux ou hydroorganique tamponné à un pH compris entre 8 et 11 et à une température voisine de 0°C.

b) On peut aussi protéger la ou les fonctions amines de l'acide de formule générale (III)-puis activer la fonction acide.

35 Les groupes protecteurs de la/des fonction(s) amine(s) peut/peuvent être éventuellement éliminés ultérieurement par des opérations qui ne touchent pas au reste de la molécule. De préférence, le groupe protecteur est un radical trityle ou tertio-butyloxycarbonyl que l'on peut éliminer en milieu acide dilué.

40

Dans le cas où l'acide-amino présente plusieurs fonctions amines, il peut y avoir, dans certaines conditions, une élimination sélective du groupe protecteur de la fonction amine en α du carbonyle qui est plus labile que les groupes protecteurs des autres fonctions amines.

La fonction amine peut être activée par estérification avec des composés hydroxylés tels que le N-hydroxysuccinimide, le p-nitrophénol, le trichloro-2,4,5 phénol ou l'hydroxy-4 pipéridine. Cet ester activé peut éventuellement être préparé in situ.

Dans ces conditions, la réaction de condensation de l'acide-amino activé et protégé avec un produit de formule (IV) s'effectue dans un solvant tel que l'acétate d'éthyle ou le diméthylformamide en présence d'un carbodiimide tel que le dicyclohexylcarbodiimide à une température comprise entre -15 et +25°C en présence, éventuellement, d'une base organique telle que la triéthylamine.

c) On peut également condenser un acide-amino de formule générale (III) dont la/les fonction(s) amine(s) est/sont éventuellement protégée(s) comme indiqué ci-dessus, avec un produit de formule (IV) dans un solvant organique tel que l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide, l'acétonitrile ou le chlorure de méthylène à une température comprise entre 0 et 30°C en présence d'un carbodiimide tel que le dicyclohexylcarbodiimide.

Le produit de départ de formule (IV) est connu sous le nom de doxorubicine. Sa préparation et ses caractéristiques physico-chimiques ont été décrites dans le brevet belge No. 731.398.

Les nouveaux produits préparés selon l'invention peuvent être transformés le cas échéant en sels d'addition avec les acides.

Les sels d'addition avec les acides peuvent être obtenus par action des nouveaux composés sur des acides dans des solvants appropriés. Comme solvants organiques on utilise par exemple des alcools, des éthers, des cétones ou des solvants chlorés ; le sel formé précipite après concentration éventuelle de sa solution et est séparé par filtration ou décantation.

Les nouveaux dérivés de la doxorubicine de formule

générale (I), ainsi que leurs sels, possèdent d'intéressantes propriétés antitumorales jointes à une faible toxicité.

Ils se sont montrés particulièrement actifs chez la souris DBA<sub>2</sub> sur la leucémie L1210 (inoculation sous-cutanée).

- 5 Les essais ont été effectués sur des souris pesant 20 à 22 g greffées par voie sous-cutanée avec 10<sup>6</sup> cellules de la leucémie L1210 et traitées à des doses journalières comprises entre 5 et 60 mg/kg i.v.

Comme produit préférentiel, on peut citer la N-(L-Leucyl) doxorubicine, c'est-à-dire le produit de formule générale (I) dans laquelle R est représenté par le radical de formule générale (II) dans laquelle R<sub>1</sub> est le radical isobutyle et R<sub>2</sub> est un atome d'hydrogène.

- La toxicité de la N-(L-Leucyl)doxorubicine chez la 15 souris se traduit par une dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) d'environ 67 mg/kg par jour (injection i.v. 2 jours consécutifs) soit 6 fois plus que pour la doxorubicine.

Chez la souris DBA<sub>2</sub>, pesant de 20 à 22 g, greffée par voie sous-cutanée avec 10<sup>6</sup> cellules de la leucémie L1210 20 et traitée i.v. (jours 1 et 2) la N-(L-Leucyl)doxorubicine, à 48 mg/kg par jour, induit 131 % d'augmentation de survie (ILS), 33 % de survivants à long terme et un volume tumoral moyen de 0,01 mm<sup>3</sup> au jour 12.

- A dose équitoxique, la doxorubicine induit 78 % ILS, 25 16 % de survivants à long terme et un volume tumoral moyen de 24 mm<sup>3</sup> au jour 12.

L'exemple suivant, donné à titre non limitatif, montre comment l'invention peut être mise en pratique.

#### EXEMPLE

- 30 On dissout 50 mg de chlorhydrate de doxorubicine dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, puis on ajoute 9 cm<sup>3</sup> d'une solution tamponnée à pH 10,2 dont la composition pour 1 litre est la suivante :

- 35 acide borique : 6,184 g  
chlorure de potassium : 7,456 g  
soude normale : 88 cm<sup>3</sup>  
eau distillée : complément à 1 litre.

On refroidit la solution à 0°C, puis on ajoute une solution de 0,001 mole de N-carboxyanhydride de L-leucine dans

0,5 cm<sup>3</sup> d'acétone refroidie à -10°C. Le mélange est agité violemment pendant 10 minutes à 0°C. On amène ensuite le pH à 4 à l'aide d'acide sulfurique 6 N. Après avoir agité la solution à pH acide pendant 10 minutes, on amène à pH 7 par addition d'une solution de soude normale. Après lyophilisation, on dissout la poudre obtenue dans 10 cm<sup>3</sup> d'un mélange de méthanol et de chloroforme (50/50 en volumes) puis sépare les sels minéraux par filtration sur 10 g de silicagel. Le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite (25 mm de mercure) à une température inférieure à 50°C. Le résidu est chromatographié sur une colonne de 2 cm de diamètre contenant 10 g de silicagel au moyen d'un éluant constitué d'un mélange de chloroforme et de méthanol (93/7 en volumes). L'éluat contenant la N-(L-Leucyl)doxorubicine est évaporé à sec sous pression réduite (25 mm de mercure) à une température inférieure à 50°C. On obtient ainsi 25,5 mg de N-(L-Leucyl)doxorubicine sous forme d'une poudre rouge.

Par dissolution de cette poudre dans une solution aqueuse contenant un équivalent d'acide chlorhydrique, puis lyophilisation de la solution obtenue, on obtient 27 mg de chlorhydrate de N-(L-Leucyl)doxorubicine fondant à 193°C (décomp.).

Pour l'emploi thérapeutique, il peut être fait usage du produit selon l'invention, soit à l'état libre, soit à l'état de sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables, c'est-à-dire non toxiques aux doses d'utilisation.

Comme exemples de sels d'addition avec les acides pharmaceutiquement acceptables, peuvent être cités des sels d'acides minéraux (tels que chlorhydrate, sulfate, nitrate, phosphate) ou organiques (tels que acétate, propionate, tartrate, théophylline-acétate, salicylate, phénolphthalinate, méthylène bis- $\beta$ -oxynaphtoate).

La présente invention comprend également les compositions médicinales contenant les produits de formule (I) ou leurs sels d'addition avec les acides en association avec tout autre produit pharmaceutiquement acceptable, qu'il soit inerte ou physiologiquement actif.

Ces compositions peuvent être présentées sous toute forme appropriée à la voie d'administration prévue. La voie parentérale est la voie d'administration préférentielle et notamment la voie intraveineuse.

000485

- Les compositions selon l'invention pour administration parentérale peuvent être des solutions stériles aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer le propylène glycol, les huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, et les esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle. Ces compositions peuvent également comprendre des adjuvants en particulier des agents mouillants, émulsifiants et dispersants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions stériles solides qui peuvent être dissoutes ou dispersées au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

- Les produits de formule générale (I) et leurs sels d'addition avec les acides sont plus particulièrement utilisés dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloblastiques, des lymphosarcomes, de la maladie de HODGKIN et des tumeurs solides (cancer pulmonaire, cancer mammaire, cancer du tube digestif et métastases), à des doses journalières généralement comprises entre 1 et 5 mg/kg par voie intraveineuse pour un adulte.

- L'exemple suivant illustre une composition selon l'invention.

#### EXEMPLE

- On prépare une solution contenant 17,39 mg/cm<sup>3</sup> de chlorhydrate de N-(L-Leucyl)doxorubicine en dissolvant 1,739 g de ce produit dans du soluté physiologique apyrogène, en quantité suffisante pour obtenir 100 cm<sup>3</sup>. La solution obtenue est répartie aseptiquement en ampoules à raison de 5 cm<sup>3</sup> par ampoule. Les ampoules sont scellées et contiennent chacune 80 mg de N-(L-Leucyl)doxorubicine (base).

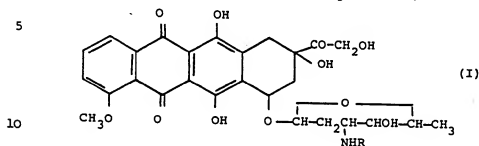
- Bien entendu diverses modifications peuvent être apportées par l'homme de l'art aux produits et procédés qui viennent d'être décrits uniquement à titre d'exemples non limitatifs sans sortir du cadre de l'invention.

9



# REVENDECATIONS

1. Nouveaux dérivés de la doxorubicine, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale :



15 dans laquelle R représente un radical de formule générale



20 dans laquelle  $R_1$  représente un atome d'hydrogène ou un radical alcoyle (éventuellement substitué par un radical amino, alcoyl-amino, dialcoylamino, hydroxy, mercapto ou méthylthio), un radical phényle un radical benzyle éventuellement substitué sur le cycle par un ou deux radicaux hydroxy et  $R_2$  représente un  
25 atome d'hydrogène ou forme avec  $R_1$  un radical alcoylène contenant 3 ou 4 atomes de carbone, étant entendu que les différents radicaux et portions alcoyle contiennent 1 à 4 atomes de carbone en chaîne droite ou ramifiée et que ledit produit dérive le cas échéant des formes D, L et DL de l'acide de formule  
30 générale



35 ainsi que ses sels d'addition avec les acides.

2. Dérivé de la doxorubicine selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale donnée dans la revendication 1 dans laquelle R représente le radical L-leucyle ainsi que ses sels d'addition avec les acides.

3 889485

3. Procédé de préparation des produits selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on fait agir un amino-acide de formule générale

5

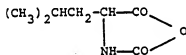


dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  sont définis comme dans la revendication 1 sous forme d'un de ses dérivés réactifs sur la doxorubicine, puis transforme éventuellement le produit obtenu en sel d'addition avec un acide.

4. Procédé de préparation du produit selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on fait réagir la L-leucine sous forme d'un de ses dérivés réactifs sur la doxorubicine puis transforme éventuellement le produit obtenu en sel d'addition avec un acide.

5. Procédé de préparation selon la revendication 4, caractérisé en ce que le dérivé réactif de la leucine est le N-carboxyanhydride de formule

20



6. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient un produit selon la revendication 1 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles ou pharmaceutiquement acceptables.

7. Composition pharmaceutique selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle contient comme produit actif le produit selon la revendication 2 en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles ou pharmaceutiquement acceptables.

Bruxelles, le 3 août 1978

P.PON. : INSTITUT INTERNATIONAL DE PATHOLOGIE CELLULAIRE  
ET MOLECULAIRE

P.PON. : Cabinet BEDE, R. van Schoonbeek

*J. Hemblon*